

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 20060153314

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

不同生理状态下核孤儿受体 TR3  
对 p53 的不同调节功能

Orphan nuclear receptor TR3 exerts distinct  
regulatory functions towards p53 under different  
physiological conditions

赵必星

指导教师姓名: 吴 乔 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2010 年 12 月

论文答辩时间: 2011 年 3 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 3 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
第一章 前言.....	5
第一节 p53 研究进展.....	5
1.1.1 概述.....	5
1.1.2 p53 的结构.....	6
1.1.3 p53 的蛋白修饰.....	8
1.1.3.1 p53 的磷酸化.....	10
1.1.3.2 p53 去磷酸化.....	12
1.1.3.3 p53 的乙酰化.....	13
1.1.3.4 p53 的去乙酰化.....	14
1.1.3.5 p53 的甲基化.....	15
1.1.3.6 p53 的去甲基化.....	15
1.1.3.7 p53 的泛素化.....	16
1.1.3.8 p53 的去泛素化.....	18
1.1.3.9 p53 的其它蛋白修饰.....	19
1.1.4 p53 的激活.....	20
1.1.4.1 p53 激活过程与信号.....	20
1.1.4.2 DNA 损伤对 p53 的诱导与激活.....	22
1.1.4.3 ARF 通路对 p53 的诱导和激活.....	24
1.1.4.4 缺氧信号诱导 p53 的激活.....	25
1.1.5 p53 的功能.....	26
1.1.5.1 p53 的转录调控功能.....	26
1.1.5.2 p53 与细胞凋亡.....	27
1.1.5.3 p53 与代谢.....	30
1.1.5.3.1 p53 对营养缺乏信号的调控.....	30
1.1.5.3.2 p53 对能量代谢的调控.....	31

1.1.5.3.3 p53 与细胞自噬 .....	32
1.1.5.3.4 p53 与氧化胁迫 .....	33
第二节 MDM2 研究进展 .....	35
1.2.1 概述 .....	35
1.2.2 MDM2 的发现 .....	35
1.2.3 MDM2 基因与蛋白质结构 .....	35
1.2.4 MDM2 的表达 .....	37
1.2.5 MDM2 的同源物 MDM4 .....	37
1.2.6 MDM2 的翻译后修饰 .....	38
1.2.6.1 MDM2 的泛素化 .....	38
1.2.6.2 MDM2 的 SUMO 化 .....	39
1.2.6.3 MDM2 的磷酸化 .....	39
1.2.6.4 MDM2 的乙酰化 .....	41
1.2.7 MDM2 的生物学功能 .....	41
1.2.7.1 MDM2 负调控 p53 .....	41
1.2.7.2 MDM2 不依赖于 p53 的功能 .....	42
1.2.7.2.1 MDM2 与细胞周期的调控 .....	43
1.2.7.2.2 MDM2 与细胞分化的调控 .....	44
1.2.7.2.3 MDM2 与 DNA 合成 .....	44
1.2.7.2.4 MDM2 与核糖体的生物合成 .....	44
第三节 DNA 依赖性蛋白激酶 (DNA-PK) 研究进展 .....	46
1.3.1 DNA 双链断裂 (DSB) 与修复 .....	46
1.3.2 DNA-PKcs 的结构 .....	47
1.3.3 DNA-PK 介导的非同源末端重组修复 .....	48
1.3.4 DNA-PK 的激活与磷酸化作用 .....	49
1.3.4.1 DNA-PK 的磷酸化底物 .....	49
1.3.4.2 DNA-PK 的自身磷酸化 .....	52
1.3.4.3 DNA-PK 的激活与调控 .....	53
第四节 Ku80 研究进展 .....	56

1.4.1 概述.....	56
1.4.2 Ku 的结构.....	56
1.4.3 Ku80 在 DNA 双链断裂修复中的作用.....	57
1.4.4 Ku80 与 V (D) J 重组.....	57
1.4.5 Ku80 的其他生物学功能.....	59
<b>第五节 核孤儿受体 TR3 研究进展 .....</b>	<b>60</b>
1.5.1 TR3 概述.....	60
1.5.2 TR3 的发现.....	60
1.5.3 TR3 的结构.....	61
1.5.3.1 A/B 转录激活区.....	62
1.5.3.2 DNA 结合区.....	62
1.5.3.3 D 区铰链区.....	62
1.5.3.4 配体结合区 LBD.....	62
1.5.4 TR3 的转录调控.....	63
1.5.5 TR3 的表达.....	64
1.5.6 TR3 的生物学功能.....	65
1.5.6.1 促进细胞增殖.....	65
1.5.6.2 诱导细胞凋亡.....	65
1.5.6.3 TR3 通过蛋白之间的相互作用调控其他蛋白的功能.....	67
1.5.7 磷酸化对 TR3 功能的调控.....	68
1.5.7.1 磷酸化调控 TR3 的亚细胞定位.....	68
1.5.7.2 磷酸化调控 TR3 的转录激活功能.....	68
1.5.7.3 磷酸化对 TR3 其它功能的调控.....	69
<b>第六节 本论文研究的目的与意义 .....</b>	<b>70</b>
<b>第二章 材料与方法 .....</b>	<b>72</b>
<b>第一节 实验材料 .....</b>	<b>72</b>
2.1.1 细胞株.....	72
2.1.2 质粒载体.....	72

2.1.3 试剂与药品.....	72
2.1.4 主要设备及仪器.....	73
第二节 实验方法 .....	75
2.2.1 大肠杆菌感受态制备.....	75
2.2.2. 质粒转化.....	75
2.2.3 质粒提取.....	75
2.2.3.1 小规模质粒提取.....	75
2.2.3.2. 大规模质粒提取.....	76
2.2.4. 表达质粒的构建.....	77
2.2.5 细胞培养.....	77
2.2.6 细胞转染.....	77
2.2.6.1 磷酸钙沉淀法.....	77
2.2.6.2 TurboFect 转染试剂转染.....	78
2.2.7 蛋白提取与 Western blot.....	78
2.2.8 免疫共沉淀.....	80
2.2.9 荧光素酶活性测定实验.....	80
2.2.10 RT-PCR 和 real-time-PCR.....	81
2.2.11 GST 沉淀实验 (GST pull down assay) .....	82
2.2.12 酵母双杂交实验.....	82
2.2.13 免疫荧光染色和观察.....	82
2.2.14 细胞凋亡检测.....	83
2.2.15 荧光光谱法测定结合常数.....	83
2.2.16 泛素化检测.....	84
2.2.17 凝胶阻滞实验 (EMSA assay) .....	84
2.2.18 DAPA (DNA affinity precipitation assay) .....	85
2.2.19 体外磷酸化.....	86
2.2.20 Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay.....	87
第三章 结果与讨论 .....	88
第一节 p53 介导孤儿受体 TR3 对 MDM2 表达的负调控 .....	88

3.1.1 TR3 负调控 MDM2 表达依赖于 p53.....	88
3.1.2 TR3 与 p53 相互作用.....	92
3.1.3 TR3 与 p53 的结合对抑制 MDM2 至关重要.....	95
3.1.4 TR3 结合 p53 抑制了其转录激活活性.....	99
3.1.5 TR3 通过 p53 介导在转录水平上下调 MDM2 表达.....	102
3.1.6 TR3 抑制 MDM2 诱导的 p53 降解.....	107
3.1.7 TR3 结合 p53 促进 MDM2 的自身泛素化.....	110
3.1.8 讨论.....	117
第二节 TR3 增强电离辐射诱导的 p53 转录和抑制 DNA 双链断裂的修复.....	122
3.2.1 TR3 与 Ku80 相互作用并抑制其与 DNA 的结合.....	122
3.2.2 TR3 与 DNA-PKcs 相互作用不依赖 Ku80.....	127
3.2.3 TR3 是 DNA-PKcs 的磷酸化新底物.....	132
3.2.4 DNA-PK 介导电离辐射诱导的 TR3 磷酸化.....	138
3.2.5 TR3 提高 DNA-PK 诱导的 p53 磷酸化与转录活性.....	141
3.2.6 TR3 诱导的细胞凋亡与 IR 诱导的 TR3 磷酸化密切相关.....	148
3.2.7 TR3 抑制 Ku80 介导的 DNA 双链断裂修复.....	150
3.2.8 讨论.....	154
参考文献.....	158



## Table of Content

<b>Abstract(in Chinese) .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract(in english) .....</b>	<b>3</b>
<b>Chapter 1 Introduction .....</b>	<b>5</b>
<b>Section 1   Researching progress of p53.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Overview .....	5
1.1.2 Stucture of p53 .....	6
1.1.3 Modification of p53 .....	8
1.1.3.1 Phosphorylation of p53 .....	10
1.1.3.2 Dephosphorylation of p53.....	12
1.1.3.3 Acetylation of p53.....	13
1.1.3.4 Deacetylation of p53 .....	14
1.1.3.5 Methylation of p53.....	15
1.1.3.6 Demethylation of p53 .....	15
1.1.3.7 Ubiquitination of p53 .....	16
1.1.3.8 Deubiquitination of p53 .....	18
1.1.3.9 Other modification of p53.....	19
1.1.4 Activation of p53.....	20
1.1.4.1 Signaling pathways of p53 activation .....	20
1.1.4.2 Induction and activation of p53 by DNA damage .....	22
1.1.4.3 Induction and activation of p53 by the ARF pathway .....	24
1.1.4.4 Oxidative stress-induced p53 activation .....	25
1.1.5 Functions of p53 .....	26
1.1.5.1 The functions of p53 on transcriptional regulation.....	26
1.1.5.2 p53 and apoptosis.....	27
1.1.5.3 p53 and metabolism .....	30
1.1.5.3.1 Regulation of nutrient deprivation signals by p53 .....	30
1.1.5.3.2 Regulation of energy production by p53 .....	31

1.1.5.3.3 p53 and autophagy .....	32
1.1.5.3.4 p53 and oxidative stress .....	33
<b>Section 2 Researching progress of MDM2 .....</b>	<b>35</b>
1.2.1 Overview .....	35
1.2.2 Identification of MDM2 .....	35
1.2.3 Structure of MDM2 .....	35
1.2.4 Expression of MDM2 .....	37
1.2.5 MDM4,a homologue of MDM2 .....	37
1.2.6 Modification of MDM2 .....	38
1.2.6.1 Ubiquitination of MDM2 .....	38
1.2.6.2 Sumoylation of MDM2 .....	39
1.2.6.3 Phosphorylation of MDM2 .....	39
1.2.6.4 Acetylation of MDM2 .....	41
1.2.7 Biological functions of MDM2 .....	41
1.2.7.1 Negative regulation of p53 by MDM2 .....	41
1.2.7.2 p53-independent function of MDM2 .....	42
1.2.7.2.1 MDM2 and cell cycle regulation .....	43
1.2.7.2.2 MDM2 and regulation of differentiation .....	44
1.2.7.2.3 MDM2 and DNA synthesis .....	44
1.2.7.2.4 MDM2 and ribosome biosynthesis .....	44
<b>Section 3 Researching progress of DNA-PK .....</b>	<b>46</b>
1.3.1 DNA double strand break (DSB) and repair .....	46
1.3.2 Structure of DNA-PK .....	47
1.3.3 DNA-PK mediated Nonhomologous DNA end joining(NHEJ) .....	48
1.3.4 Activation and phosphorylation of DNA-PK .....	49
1.3.4.1 Phosphorylation substrates of DNA-PK .....	49
1.3.4.2 Auto-phosphorylation of DNA-PK .....	52
1.3.4.3 Activation and regulation of DNA-PK .....	53
<b>Section 4 Researching progress of Ku80 .....</b>	<b>56</b>

1.4.1 Overview .....	56
1.4.2 Structure of Ku .....	56
1.4.3 The functions of Ku80 on DNA double strand break repair .....	57
1.4.4 Ku80 and V (D) J recombination .....	57
1.4.5 Other biological functions of Ku80 .....	59
<b>Section 5 Researching progress of orphan receptor TR3 .....</b>	<b>60</b>
1.5.1 Overview of TR3 .....	60
1.5.2 Identification of TR3 .....	60
1.5.3 Structure of TR3 .....	61
1.5.3.1 A/B region .....	62
1.5.3.2 DNA binding domain .....	62
1.5.3.3 D region .....	62
1.5.3.4 Ligand binding domain LBD .....	62
1.5.4 Transcriptional regulation of TR3 .....	63
1.5.5 Expression of TR3 .....	64
1.5.6 Biological functions of TR3 .....	65
1.5.6.1 Cell proliferation .....	65
1.5.6.2 Cell apoptosis .....	65
1.5.6.3 TR3 regulates other proteins through protein-protein interaction .....	67
1.5.7 Regulation of TR3 by phosphorylation .....	68
1.5.7.1 Phosphorylation influences subcellular localization of TR3 .....	68
1.5.7.2 Phosphorylation regulates transactivity of TR3 .....	68
1.5.7.3 Other functions of TR3 regulated by phosphorylation .....	69
<b>Section 6 Purpose and Significance of this thesis .....</b>	<b>70</b>
<b>Chapter 2 Materials and Methods .....</b>	<b>72</b>
<b>Section 1 Materials .....</b>	<b>72</b>
2.1.1 Cell lines .....	72

2.1.2 Plasmids .....	72
2.1.3 Chemicals and reagents.....	72
2.1.4 Equipments .....	73
<b>Section 2 Methods .....</b>	<b>75</b>
2.2.1 Competent cells.....	75
2.2.2. Transformation.....	75
2.2.3 Extraction of Plasmids .....	75
2.2.3.1 Extraction of small-scale plasmids .....	75
2.2.3.2. Extraction of large-scale plasmids .....	76
2.2.4. Construction of plasmids .....	77
2.2.5 Cell culture.....	77
2.2.6 Transfection .....	77
2.2.6.1 Method of calcium phosphate precipitation.....	77
2.2.6.2 TurboFect transfection reagent .....	78
2.2.7 Protein preparation and Western blot .....	78
2.2.8 Co-immunoprecipitation.....	80
2.2.9 Luciferase reporter assay .....	80
2.2.10 RT-PCR and real-time-PCR.....	81
2.2.11 GST pull down assay .....	82
2.2.12 Yeast two-hybrid protein interaction assay .....	82
2.2.13 Immunofluorescent staining and microscopic observation.....	82
2.2.14 Apoptosis and cell cycle analysis .....	83
2.2.15 Fluorescence measurements.....	83
2.2.16 Ubiquitination assay.....	84
2.2.17 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).....	84
2.2.18 DNA affinity precipitation assay (DAPA).....	85
2.2.19 <i>In vitro</i> phosphorylation assay .....	86
2.2.20 Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay.....	87
<b>Chapter 3 Result and discussion .....</b>	<b>88</b>

<b>Section 1 p53 mediates the negative regulation of MDM2 by orphan receptor TR3 .....</b>	<b>88</b>
3.1.1 p53 is required for the inhibition of MDM2 by TR3 .....	88
3.1.2 TR3 physically interacts with p53 .....	92
3.1.3 Interaction with p53 is crucial for TR3 to inhibit MDM2 .....	95
3.1.4 Binding of TR3 represses p53 transcriptional activity .....	99
3.1.5 TR3 downregulates MDM2 transcription via p53 .....	102
3.1.6 TR3 inhibits MDM2-induced degradation of p53 .....	107
3.1.7 TR3 binding to p53 promotes MDM2 ubiquitination.....	110
3.1.8 Discussion.....	117
<b>Section 2 The orphan nuclear receptor TR3 enhances p53 transactivation and represses DSB repair under ionizing radiation .....</b>	<b>122</b>
3.2.1 TR3 interacts with Ku80 to repress its DNA-end binding.....	122
3.2.2 TR3 interacts with DNA-PKcs independently of Ku80.....	127
3.2.3 TR3 is a novel phosphorylation substrate of DNA-PKcs .....	132
3.2.4 IR stimulates the phosphorylation of TR3 through DNA-PK .....	138
3.2.5 TR3 enhances the DNA-PK-induced phosphorylation and transcriptional activity of p53 .....	141
3.2.6 TR3-induced hepatoma cell apoptosis correlates with its phosphorylation by IR.....	148
3.2.7 TR3 represses the DSB repair pathway mediated by Ku80.....	150
3.2.8 Discussion.....	154
<b>Reference.....</b>	<b>158</b>

## 摘 要（一）

### p53 介导孤儿受体 TR3 对 MDM2 的负调控

MDM2 作为一个癌基因表达的蛋白，当其在细胞内过表达的时候就被激活，并促使细胞发生转化。孤儿受体 TR3 作为一个核转录因子，能够调控基因的表达。近年的研究发现，TR3 能够负调控 MDM2 的蛋白表达水平。但是，其作用机制仍然不清楚。通过研究，我们首次发现，TR3 对 MDM2 的负调控作用是由 p53 介导的。首先，TR3 能够直接结合 p53，而不与 MDM2 直接结合，并且 TR3 与 p53 的结合对其抑制 MDM2 蛋白表达是必需的。通过进一步的研究，我们发现 TR3 通过与 p53 的结合阻断 p53 的乙酰化，从而抑制 p53 的转录活性，在转录水平上导致 MDM2 基因表达的减少。另外，TR3 结合 p53 蛋白可以抑制 p53 被 MDM2 的泛素化降解，提高 p53 蛋白的稳定性，并导致 MDM2 自身泛素化降解，揭示了 p53 在蛋白水平上介导 TR3 对 MDM2 的负调控。另外，紫外辐射诱导的细胞调亡是由 p53 介导的。我们则发现，当 TR3 过表达时，p53 介导的紫外对细胞调亡诱导作用显著增强，揭示了 TR3 对 p53 调控的生物学功能。总之，我们的研究表明，p53 从转录水平和转录后水平可以介导 TR3 对 MDM2 的负调控作用。这个研究为以 TR3 作为潜在的药物靶点研究抗肿瘤药物、抑制 MDM2 诱导的肿瘤发生提供了重要的理论指导。

关键词：乙酰化；MDM2；TR3；p53；泛素化

## 摘 要（二）

### TR3 增强电离辐射诱导的 p53 转录和抑制 DNA 双链断裂的修复

当电离辐射（IR）诱导细胞 DNA 发生双链断裂（DSB）时，细胞通过启动一系列应答机制，诱导细胞周期阻滞、DNA 修复或者细胞凋亡，维持基因组的稳定性。在哺乳动物细胞中，DNA 依赖性蛋白激酶（DNA-PK）是参与 DNA 双链断裂修复的核心蛋白。DNA-PK 是由 DNA 依赖性蛋白激酶催化亚基（DNA-PKcs）和 Ku 蛋白调节亚基（包括 Ku70 和 Ku80）组成的蛋白复合体，它还作为 p53 的上游信号分子，受 IR 激活并选择性调控 p53 依赖的 IR 诱导的细胞凋亡。本论文研究发现，核孤儿受体 TR3 通过抑制 Ku80 的 DNA 末端结合活性抑制了 DNA DSB 的修复，同时在肝癌细胞中 TR3 促进了 DNA-PK 诱导的 p53 的激活。首先，TR3 通过与 Ku80 结合，抑制了 Ku80 结合到 DNA 末端，从而抑制了 DSB 的修复。另一方面，TR3 能够作为 DNA-PK 的新底物，以不依赖于 Ku80 的方式同 DNA-PKcs 结合，并被 DNA-PKcs 磷酸化。磷酸化的 TR3 反过来增强了 DNA-PK 诱导的 p53 磷酸化与转录活性，从而提高 IR 诱导的肝癌细胞凋亡。本论文的研究揭示了 TR3 在调控 DNA 修复以及 IR 诱导的肝癌细胞凋亡的全新功能，揭示 TR3 可能是肿瘤放射治疗的一个全新靶点。

关键词：TR3；DNA-PK；Ku80；DNA 双链断裂修复；p53 转录激活

## **Abstract (part one)**

### **p53 mediates the negative regulation of MDM2 by orphan receptor TR3**

MDM2 is an oncoprotein whose transforming potential is activated by overexpression. The expression level of MDM2 is negatively regulated by orphan receptor TR3 that mainly acts as a transcriptional factor to regulate gene expression. However, the underlying mechanism is largely unclear. Here, we present the first evidence that inhibition of TR3 on MDM2 is mediated by p53. We found that TR3 directly interacts with p53 but not MDM2, and such interaction is critical for TR3 to inhibit MDM2 expression. TR3 downregulates p53 transcriptional activity by blocking its acetylation, thereby leading to a decrease in the transcription levels of MDM2. Furthermore, TR3 binding to p53 obstructs its ubiquitination and degradation induced by MDM2, resulting in the MDM2 ubiquitination and degradation. In addition, TR3 could enhance p53-mediated apoptosis induced by UV irradiation. Taken together, our findings demonstrate that p53 mediates the suppression of TR3 on MDM2 at both transcriptional and post-transcriptional level and suggest TR3 as a potential target to develop new anticancer agents that restrict MDM2-induced tumor progression.

**Keywords:** acetylation; MDM2; orphan receptor TR3; p53; ubiquitination



## **Abstract (part two)**

### **The orphan nuclear receptor TR3 enhances p53 transactivation and represses DSB repair under ionizing radiation**

In response to ionizing radiation (IR)-induced DNA double-strand break (DSB), cells elicit an evolutionarily conserved checkpoint response that induces cell cycle arrest, DNA repair or apoptosis, and thereby maintain genomic stability. A central enzyme involved in DSB repair in mammalian cells is DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), which comprises a catalytic subunit (DNA-PKcs), and the Ku subunits Ku70 and Ku80 that act as the regulatory elements. DNA-PK also functions as a signaling molecule upstream of p53 to selectively regulate p53-dependent apoptosis in response to IR. In our current study, we demonstrate that the orphan receptor TR3 suppresses DSB repair by blocking Ku80 DNA-end binding activity and promoting DNA-PK-induced p53 activity in hepatoma cells. We find that TR3 interacts with Ku80 and inhibits its binding to DNA ends, which then suppress DSB repair. On the other hand, TR3 is found to be a phosphorylation substrate of DNA-PK and also to interact with DNA-PKcs in a Ku80-independent manner. Phosphorylated TR3 in turn enhances DNA-PK-induced phosphorylation and the transcriptional activity of p53, thereby enhancing hepatoma cell apoptosis induced by IR. Taken together, our findings reveal novel functions of TR3, not only in DSB repair regulation, but also in IR-induced hepatoma cell apoptosis, and suggest that TR3 is a potential target for cancer radiotherapy.

**Keywords:** Orphan receptor Nur77; DNA-PK; Ku80; DSB repair; p53 transactivation.

# 第一章 前言

## 第一节 p53 研究进展

### 1.1.1 概述

p53 作为一个著名的肿瘤抑制因子，在细胞受到刺激条件下，包括癌基因的激活和 DNA 损伤等，能够调控细胞的周期、衰老、凋亡等活动<sup>[1]</sup>。p53 的发现已经超过 30 年的历史了，而从其第一次被称为抑癌基因也已经超过 20 年。由于 p53 在细胞内众多的生物学功能，特别是在癌症发生中的作用使其特别受到人们的关注，曾被誉为“基因组的守护者”<sup>[2]</sup>、“细胞的守门人”<sup>[1]</sup>。作为一种重要的抑癌基因，p53 与人类肿瘤的发生有着密切的关系。大约有 50% 以上的人类肿瘤发生与 p53 基因突变相关<sup>[3]</sup>。p53 蛋白具有很短的半衰期，在正常哺乳动物细胞中，泛素 E3 连接酶 MDM2 可以通过泛素蛋白酶体途径降解 p53，使 p53 维持在较低的蛋白水平。但是，一旦细胞受到刺激，p53 的泛素化被抑制，使得 p53 蛋白表达水平趋于稳定，在细胞中聚集并在核内形成同源四聚体<sup>[4]</sup>。作为转录因子，激活的 p53 四聚体可以结合到 DNA 特异的序列上，激活或者抑制不同的靶基因转录<sup>[5]</sup>。目前已经发现，p53 可以转录调控的基因超过 150 个，这些基因大部分都与细胞周期阻滞、细胞凋亡和 DNA 损伤修复相关，表明 p53 在这一过程中主要功能是预防受损细胞的进一步增殖来抑制癌症的发生。此外，p53 还可以通过直接转运到线粒体，与线粒体上的抗凋亡蛋白如 BCL-2 和 BCL-xl 相互作用，直接诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[6]</sup>。因此，在细胞受到外界刺激的情况下，p53 被激活，从而介导细胞对这些信号产生不同的应答，决定细胞的命运。

如图 1.1 所示，外界信号刺激，包括紫外损伤、电离辐射、癌基因的激活等信号通过激活各种蛋白激酶或乙酰转移酶，调控 p53 的磷酸化或乙酰化。这些翻译后修饰导致了 p53 的稳定和激活，此时 p53 以四聚体的形式结合到靶基因上序列特异性的 DNA 结合位点上，激活或者抑制靶基因的转录，使细胞产生不同的应答，如凋亡、细胞周期阻滞或 DNA 修复等。当细胞不再需要 p53 的时候，p53 就通过 MDM2 的介导发生泛素化修饰，并转运到细胞浆中通过 26S 蛋白酶体降解。

此外，胞浆中的 p53 还能够直接定位到线粒体上，通过结合到 BCL2 等抗凋亡蛋白上，诱导细胞凋亡。

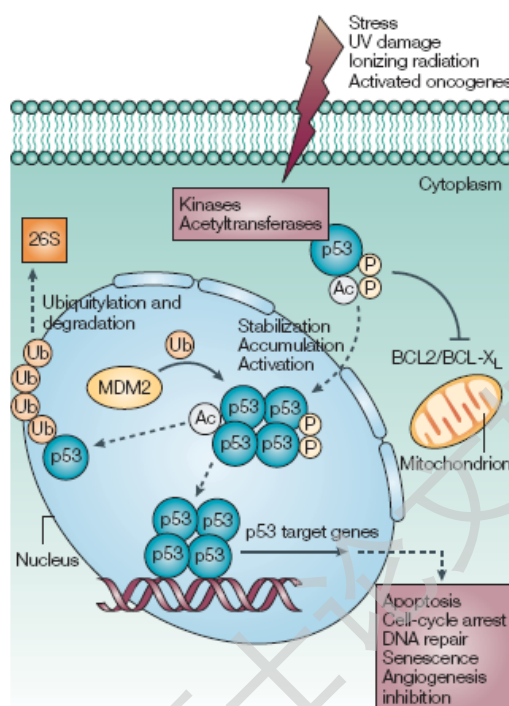


图 1.1: p53 的活化与细胞应答 (引自文献[7])

Fig.1.1 Activation of p53 and cellular response. Stress signals converge on p53 and activate various protein kinases and/or acetyltransferases, which phosphorylate or acetylate p53, respectively. These posttranslational modifications generally result in stabilization and activation of p53 in the nucleus, where p53 interacts with sequence-specific DNA binding sites of its target genes. The transcriptional activation leads to diverse cellular responses such as apoptosis, cell-cycle arrest or DNA repair. When p53 is no longer needed, it is targeted for ubiquitylation by MDM2 and moved out of the nucleus to be degraded by the 26S proteasome. p53 can also act outside of the nucleus to induce apoptosis by binding with anti-apoptotic proteins such as BCL2.

### 1.1.2 p53 的结构

p53 基因 (20 kb) 是位于人 17 号染色体短臂上一个单拷贝基因，包含 11 个外显子和 10 个内含子，其 mRNA 长 2.5 kb，编码一个含有 393 个氨基酸的蛋白

质，分子量 53 kD。p53 蛋白结构包括 N 端、中间核心区域以及 C 端的多功能结构域。如图 1.2 所示，p53 的 N 端包含转录激活区和 SH3 区域，中间为 DNA 结合区，C 端包括四聚化区域和 C 末端调控区。

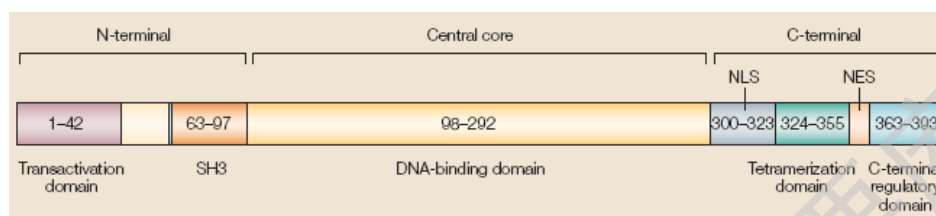


图 1.2 p53 结构示意图（引自文献[7]）

Fig.1.2 Structure of p53. The N-terminal portion consists of the transactivation domain and a Src homology 3-like (SH3) domain. The transactivation domain is required for transactivation activity and interacts with various transcription factors, acetyltransferases and the MDM2 ubiquitin ligase. The SH3 domain is a proline-rich domain required for interaction of p53 with SIN3, which protects p53 from degradation. The central core is made up primarily of the DNA-binding domain and the C-terminal end contains nuclear localization and export signals (NLS and NES, respectively), a regulatory domain and the tetramerization domain. Numbers indicate residue number.

N 端转录激活区（Transactivation domain，TAD）除了与转录因子 TFIID 结合而发挥转录激活功能外，还是许多转录因子、乙酰转移酶和 MDM2 泛素连接酶的结合区域。Src homology 3-like(SH3)区域富含脯氨酸，能够与 SIN3 相互作用，从而保护 p53 不被降解。中间核心区主要是 DNA 结合区（DNA-binding domain，DBD），能特异地结合靶基因中的顺式作用元件，调节靶基因的转录活性。C 端包括核定位序列 NLS 和核输出序列 NES。C 末端调控区域（C-terminal regulatory domain）在 DNA 损伤时，招募其他蛋白到损伤部位，提供 DNA 损伤信号<sup>[8]</sup>。四聚化区域（Tetramerization domain）位于氨基酸 324-355 区域，介导活化后 p53 四聚体的形成<sup>[9]</sup>。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库